

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

11 N° de publicat  
(A n'utiliser que pour  
le classement et les  
commandes de reproduction).

2.221.122

21 N° d'enregistrement national

73.08934

(A utiliser pour les paiements d'annuités,  
les demandes de copies officielles et toutes  
autres correspondances avec l'I.N.P.I.)

# DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

1<sup>re</sup> PUBLICATION

22 Date de dépôt ..... 13 mars 1973, à 16 h 30 mn.

41 Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. - «Listes» n. 41 du 11-10-1974.

51 Classification internationale (Int. Cl.) A 61 k 9/00//C 07 c 103/52.

71 Déposant : Société dite : BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, résidant en République Fédérale  
d'Allemagne.

73 Titulaire : *Idem* 71

74 Mandataire : Simonnot, Rinuy, Santarelli.

54 Nouveaux liposomes contenant des composés chimiques et leur procédé de préparation.

72 Invention de :

33 32 31 Priorité conventionnelle :

La présente invention concerne la préparation de liposomes ayant un diamètre maximal de 1000 Å, de préférence de 200 à 500 Å. Les parois de ces liposomes sont constituées par des couches mono-, bi- ou multi-moléculaires, mais de préférence par des couches bimoléculaires ayant une épaisseur approximative de 30 à 100 Å. Les substances qui sont utilisées pour la préparation des liposomes, répondent à la formule générale :



dans laquelle X est un groupe hydrophile polaire et Y est un groupe hydrophobe non polaire. Par exemple, X désigne un reste phosphate, carboxyle, sulfate, amino, hydroxyle ou choline et Y désigne un reste d'hydrocarbure saturé ou insaturé, par exemple un groupe alkyle, alcényle ou alcynyle, qui peut être substitué le cas échéant, par exemple, par un reste aromatique ou cycloaliphatique.

Toutefois, ceci ne représente que quelques exemples de définitions très avantageuses de X et Y.

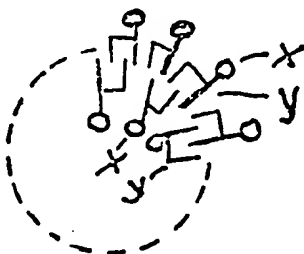
Pour encapsuler des médicaments et des substances analogues, il convient d'utiliser entre autres des phospholipides tels que la lécithine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine, l'acide phosphatidique, etc.

Pour préparer des liposomes, il convient d'utiliser principalement deux procédés simples. Dans le premier procédé, on ajoute un lipide à une phase aqueuse et on chauffe légèrement le mélange, puis on l'agite énergiquement par secousses, après quoi on le traite aux ultra-sons jusqu'à ce que les liposomes aient été formés. Leur formation se manifeste par une clarification partielle et l'apparition d'une légère opalescence bleueâtre.

Dans le second procédé, on prépare un système en dispersion, de préférence un colloïde linéaire, que l'on obtient de la façon la plus simple en transformant en minces pellicules, par évaporation du solvant, une phase dispersée dissoute dans ce solvant, et en faisant ensuite entrer ces pellicules en contact avec une phase continue aqueuse ou non aqueuse, sous

agitation énergétique. Le système ainsi produit est ensuite traité aux ultra-sons pendant une période prolongée de temps ; les molécules de la phase dispersée s'orientent alors dans un ordre tout à fait déterminé, dont la structure est reproduite sur le schéma suivant. Ces édifices représentent un état particulièrement favorable du point de vue thermodynamique, en sorte qu'ils ont une grande stabilité et qu'ils peuvent être conservés pendant des mois.

Schéma :



10 X et Y ont les définitions données ci-dessus.

Dans les deux procédés décrits ci-dessus, les liposomes formés peuvent être séparés du mélange réactionnel, par exemple par ultra-centrifugation, chromatographie, etc.

15 L'application des procédés décrits offre un intérêt particulier pour l'encapsulage de médicaments ou de substances actives cosmétiques, la dimension diamétrale maximale de 1000 Å des liposomes obtenus représentant un progrès important par rapport aux micro-capsules usuelles.

20 On mentionne ci-après trois propriétés de ces liposomes, en tant que nouvelles formes d'application d'un intérêt particulier pour des substances actives pharmaceutiques ou cosmétiques.

1. Les liposomes formés sont extrêmement stables et peuvent donc protéger les solutions de substances chimiques qu'ils renferment (par exemple des médicaments, des protides, des enzymes, des hormones, des vitamines, etc.) de conditions ambiantes extrêmes ou nuisibles (par exemple pendant le passage dans les voies gastro-intestinales) et ils permettent donc éga-

lement l'administration par voie orale de médicaments sensibles.

2. Les liposomes individuels sont si petits que leur pouvoir de pénétration est extrêmement grand, ce qui permet de leur faire traverser sans difficulté des membranes biologiques.

5 3. Par le choix approprié des substances utilisées pour la préparation des parois des liposomes, on peut influencer les charges exercées à la surface des liposomes et, par conséquent, diriger ces derniers, avec la substance active qu'ils renferment, préférentiellement dans un organe déterminé. Ainsi, par exemple,  
10 dans le cas de liposomes renfermant une lécithine et la stéarylamine, le potentiel de surface est positif, tandis que dans le cas de liposomes formés par exemple à partir de phosphatidyl-inositol, le potentiel de surface est négatif.

L'application thérapeutique de nombreux médicaments,  
15 principalement de protéc-hormones, telles que l'insuline, l'ocytocine, la vasopressine, l'hormone adrénocorticotrope, la calcitonine, la sécrétine, la kallicroïne, l'inhibiteur de kallicroïne, les relaxine-quinines, le glucagon, ainsi que d'autres médicaments facilement inactivables tels que l'adrénaline, la  
20 tubocurarine ou des drogues de résorption difficile telles que la digitaline, notamment la strophantine ou des stéroïdes tels que des oestrogènes ou la testostérone, a été jusqu'à présent limitée aux voies sous-cutanée ou intraveineuse, parce que ces  
25 composés sont décomposés dans l'estomac ou dans l'intestin en produits inactifs, ou parce qu'ils ne sont que difficilement résorbés dans l'intestin.

Dans tous les cas dans lesquels un tel médicament doit être utilisé en thérapeutique régulièrement pendant des années, une administration par voie orale signifie un grand  
30 progrès. La présente invention permet de préparer une forme d'administration des médicaments mentionnés ci-dessus, notamment de l'insuline, que l'on peut faire absorber de façon illimitée par voie orale, les substances actives encapsulées n'étant alors libérées qu'à l'endroit désiré.

35 Dans des tests effectués sur des souris blanches, il a été possible d'engendrer par exemple un choc hypoglycémique par administration orale d'une préparation d'insuline sous la

forme de liposome, avec le double de la dose qui était nécessaire pour engendrer le choc par voie sous-cutanée. Chez des animaux témoins, même avec une dose 20 fois supérieure à la dose habituelle d'insuline, administrée par voie orale, il n'a pas été possible

5 de faire apparaître les symptômes d'une action de l'insuline. Dans un autre test d'activité des nouvelles préparations, on a administré à des souris blanches par voie sous-cutanée la dose usuelle de tubocurarine et par voie orale une dose 3000 fois plus forte. Toutes les souris traitées par voie sous-cutanée sont

10 mortes, tandis que les grandes quantités administrées par voie orale n'ont engendré aucun symptôme. Mais dès que la tubocurarine a été administrée sous la forme incluse dans des liposomes de lécithine, les souris ont pu être tuées avec la quantité sous-cutanée de tubocurarine administrée par voie orale.

15 On a constaté que la quantité utilisée de composé X - Y (lipides) est déterminante pour la préparation de ces liposomes administrables par voie orale et que suivant le type du lipide, elle est optimale dans la gamme de 0,01 à 50 mg par millilitre de solution du médicament.

20 Les liposomes conformes à l'invention conviennent, non seulement comme forme optimale pour des substances actives administrées par voie orale, mais aussi pour de nombreuses autres applications. Ainsi, par exemple, l'excellent pouvoir de pénétration des liposomes permet une application extrêmement effi-

25 cace de médicaments et de cosmétiques par application sur la peau. Les liposomes pénètrent sans difficulté dans la peau et les tissus, si bien que des substances hydrosolubles peuvent agir à l'endroit désiré, alors que d'habitude, elles ne peuvent pas pénétrer dans la peau.

30 De même, la présente invention permet d'obtenir des préparations de liposomes administrables par inhalation, agissant de façon excellente, et à l'endroit désiré.

#### Exemple 1

Pour encapsuler 300 mg de théophilline, on dissout

35 9 mg de lécithine dans 10 ml de chloroforme et on concentre par évaporation dans un ballon à fond rond, de manière que la lécithine résiduelle soit répartie aussi uniformément que possible

sur la paroi du ballon. Ensuite, la solution de théophilline (300 mg de théophilline dans 3 ml de tampon tris 0,1 M, pH 8,5) est introduite dans le ballon et agitée énergiquement par secousses pendant quelques minutes. Après la formation d'une émulsion blanche, on traite cette émulsion aux ultra-sons pendant une demi-heure. Le système en dispersion se clarifie et la suspension des liposomes formés se présente comme un liquide pratiquement transparent. Les vésicules formées, qui contiennent à présent la solution de théophilline, peuvent être séparées de la

5 lécithine non mobilisée dans la formation de la structure, par ultra-centrifugation pendant une heure à 100 000 g. Pour séparer les liposomes de la solution de théophilline non incluse dans la structure, on procède à une chromatographie sur "Sepharose".

10

15 Exemple 2

Pour encapsuler 100 mg d'insuline, on dissout 3 mg de phosphatidylinositol dans 10 ml de chloroforme et on concentre la solution par évaporation dans un ballon à fond rond, de manière à former sur toute la paroi intérieure une pellicule

20 uniforme de phosphatidylinositol. Ensuite, on introduit dans le ballon une solution d'insuline (100 mg d'insuline dans 3 ml de tampon de phtalate 0,1 M, pH 4,0) et on effectue ensuite le même traitement que dans l'exemple 1.

Exemple 3

25 On dissout 1 g de trypsine dans 30 ml de tampon au phosphate 0,1 M (pH 7) et on introduit la solution dans un ballon à fond rond de 500 ml, puis on superpose une couche de 15 ml de chloroforme contenant en solution 15 ml de lécithine. Ensuite, on raccorde le ballon à un évaporateur à couche mince

30 et on le fait tourner très rapidement à 30°C pour chasser le chloroforme par évaporation sous pression de 0,1 bar. L'émulsion qui se forme est traitée aux ultra-sons comme dans l'exemple 1, et les liposomes sont ensuite séparés du résidu, également par chromatographie.

35 Exemple 4

On ajoute 4 mg de lécithine par millilitre à une solution de tubocurarine à 0,1 mg/ml et on maintient la solu-

- tion à 30°C sous agitation permanente par secousses pendant un certain temps (10 à 20 mn). Ensuite, on traite l'émulsion formée aux ultra-sons pendant 15 à 30 mn, jusqu'à formation d'un colloïde présentant une opalescence bleuâtre, ce qui est un indice de la formation des liposomes. Après ultra-centrifugation pendant 10 mn, au cours de laquelle la matière lipidique non utilisée dans la formation des liposomes se sédimente, on peut séparer les liposomes de la solution non utilisée dans leur formation, par chromatographie sur colonne de "Sephadex" ou de "Sepharose".
- 10 La suspension de liposomes ainsi obtenue peut être administrée directement par voie orale.

Exemple 5

- En procédant comme indiqué dans l'exemple 4, on traite de l'insuline avec de la lécithine très pure pour
- 15 former une préparation de liposomes pouvant être administrée par voie orale.

REVENDICATIONS

1. Liposomes contenant des composés chimiques, caractérisés par le fait que ces composés sont enveloppés de couches de préférence bimoléculaires, qui sont conformées en liposomes  
5 extrêmement petits, de diamètre maximal égal à 1000 Å, ces couches étant formées de substances de formule générale :



dans laquelle X désigne un groupe hydrophile polaire et Y désigne un groupe hydrophobe non polaire.

- 10 2. Procédé de préparation de liposomes, caractérisé par le fait que les liposomes sont produits par traitement aux ultra-sons, d'un système en dispersion, la phase continue du système contenant à l'état dissous le composé à encapsuler, tandis que la phase dispersée contient la substance formant les  
15 liposomes.

3. Procédé suivant la revendication 2, caractérisé par le fait que le système traité en dispersion est un système colloïdal linéaire que l'on obtient par mise en contact de couches minces de la phase dispersée, sous agitation énergétique,  
20 avec la phase continue.

4. Procédé suivant l'une des revendications 2 et 3, caractérisé par le fait qu'on utilise des lipides ou des lipofides pour former la phase dispersée.

5. Procédé suivant l'une des revendications 2 et  
25 3, caractérisé par le fait qu'on utilise des phospholipides comme phase dispersée.

6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé par le fait qu'il est appliqué à l'encapsulage de médicaments, d'enzymes ou d'insuline.

- 30 7. Procédé de préparation d'insuline, administrable par voie orale, caractérisé par le fait qu'on inclut l'insuline dans des liposomes qui ont un diamètre maximal de 800 Å, et de préférence de 200 à 500 Å et la matière utilisée pour la réalisation des liposomes consiste en substances de formule générale :





dans laquelle X est un groupe hydrophile polaire et Y est un groupe hydrophobe non polaire.

8. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé par le fait que les liposomes sont produits par traitement aux  
5 ultra-sons d'un système en dispersion, la phase continue du système contenant de l'insuline dissoute, tandis que la phase dispersée contient la matière qui forme les liposomes.

9. Procédé suivant l'une des revendications 7 et 8, caractérisé par le fait que le système traité en dispersion  
10 est un colloïde linéaire que l'on obtient par mise en contact de couches minces de la phase dispersée avec la phase continue, sous agitation énergétique.

10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé par le fait qu'on utilise des lipides ou  
15 des lipoïdes pour la phase dispersée, c'est-à-dire comme matière engendrant les liposomes.

11. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé par le fait qu'on utilise des lécithines pour former la phase dispersée.

20 12. A titre de produits industriels nouveaux, des liposomes obtenus notamment au moyen d'un procédé suivant l'une quelconque des revendications 2 à 11.

13. Liposomes à base d'insuline, administrables par voie orale, obtenus notamment au moyen d'un procédé suivant  
25 l'une quelconque des revendications 7 à 11.